

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 39/00, 48/00</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/50067</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>12. November 1998 (12.11.98)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98/02679</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>7. Mai 1998 (07.05.98)</b>		(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERRING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-13342 Berlin (DE).	
(30) Prioritätsdaten: <b>197 20 761.8 7. Mai 1997 (07.05.97) DE</b>		(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DONNER, Peter [DE/DE]; Steglitzer Damm 7a, D-12169 Berlin (DE). GOEBEL, Werner [DE/DE]; Am Hubland 12, D-97218 Gerbrunn (DE). DEMUTH, Andreas [DE/DE]; Zehnhoferstrasse 12, D-97080 Würzburg (DE). GENTSCHEV, Ivaylo [BG/DE]; Bauweg 5, D-97270 Kist (DE). HESS, Jürgen [DE/DE]; Liegnitzstrasse 31, D-10318 Berlin (DE). KAUFMANN, Stefan [DE/DE]; Am Rosenanger 57A, D-13465 Berlin (DE).	
<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>			

(54) Title: USE OR A SECRETION VECTOR FOR FERTILITY CONTROL BY ORAL VACCINATION

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES SEKRETIONSEVEKTORS ZUR FERTILITÄTSKONTROLLE DURCH ORALE VAKZINIERUNG

(57) Abstract

The invention relates to a fertility-control method by oral vaccination using attenuated salmonellae or other gram-negative attenuated vaccination strains. Different systems of expression are used which enable a specific MHCII/CD4 or MHCII/CD8 immune response to be generated.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Fertilitätskontrolle durch orale Vakzinierung mittels attenuierter Salmonellen oder anderer Gram-negative attenuierter Impfstämme unter Verwendung verschiedener Expressionssysteme, welche die Erzeugung einer gezielten MHCII/CD4 oder MHCII/CD8 Immunantwort erlaubt, beschrieben.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung eines Sekretionsvektors zur Fertilitätskontrolle durch orale Vakzinierung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Fertilitätskontrolle durch orale Vakzinierung mittels attenuierter Salmonellen oder anderer Gram-negativer attenuierter Impfstämme unter Verwendung verschiedener Expressionssysteme, welche die Erzeugung einer gezielten MHCII/CD4 oder MHCII/CD8 Immunantwort erlauben.

Stand der Technik

Es ist seit langem bekannt, daß Frauen und Männer mit signifikant hohen Antikörpertitern gegen menschliche Spermien oft infertil sind oder eine reduzierte Fertilität aufweisen (Ingerslev und Ingerslev, 1989; Chen und Jones, 1981; Menge et al., 1982; Bronson et al., 1984). Es wurde ebenso gezeigt, daß die Immunisierung von weiblichen und männlichen Tieren mit Extrakten von gesamten Spermien zur Induktion einer Infertilität führen kann (Kummerfeld und Foote, 1979; Munoz und Metz, 1978; Tung et al., 1979; Menge et al., 1979). Primakoff et al. (1988a) verwendeten einen monoklonalen Antikörper, um das Meerschweinchen-spezifische Spermien-oberflächenantigen PH-20 zu isolieren und konnten zeigen, daß die Injektion von diesem gereinigten Antigen in weiblichen oder männlichen Meerschweinchen eine langanhaltende Immunisierung gegen Fertilität erzeugt (1988b). Für eine Anzahl anderer monoklonaler Antikörper, die gegen ejakulierte humane Spermien oder isolierte Spermien anderer Spezies gerichtet sind, konnte gezeigt werden, daß sie mit menschlichen Spermien kreuzreagieren. Einige reagieren mit Komponenten des seminalen Plasmas und andere erkennen Antigene testiculären Ursprungs. Monoklonale Antikörper, welche humane Spermien immobilisieren oder agglutinieren oder die Spermienbindung und die Penetration von zonafreien Hamsteroocyten inhibieren, sind beschrieben worden. Zur Zeit sind mehrere humane Spermienantigene bekannt, wie zum Beispiel das  $M_r$  95,000 Antigen (Moore et al., 1987); das 55 kDa Antigen, welches von den S36-37 mAbs (HSA-63) von Lee (Liu et al., 1990) erkannt wird; und das humane Homolog der Spermienrezeptoren von ZP-C (in der Maus bestimmt von Saling und Bliel und Wassarman (Bliel, 1990; Leyton und Saling,

1989). Von weiterem Interesse ist das FA-1 Antigen der Maus und des Menschen, welches zum Teil charakterisiert wurde (Naz, 1988) und das 24kDa Antigen aus Rattentestis und menschlicher Testis (Shaha et al., 1990). Die von Moore und Lee charakterisierten Antigen wie auch das SP-10 Immunogen wurden von der "World Health Organization" (Sonderbereich für Vakzine zur Fertilitätsregulation) als primäre Vakzinekandidaten beschrieben (Anderson et al., 1987). Auch die drei Proteinkomponenten der Zona pellucida (ZP), einer extrazellulären Matrix, die das Säugerei umgibt, eignen sich als Antigene. Diese Proteine werden in der Regel als ZPA, ZPB und ZPC bezeichnet (Wassermann, 1987, Science 235, 553-560). Durch eine immunologische Blockade soll hierbei die Ei-Spermium-Interaktion blockiert oder beeinflußt werden. Versuche mit rekombinant hergestelltem ZPC, dem Zona Protein, welches für die initiale Bindung des Spermiums an die Zona verantwortlich gemacht wird, haben dies auch bestätigt. In allen bisher berichteten Fällen kam es allerdings bei langfristiger Immunisierung zu einer irreversiblen Schädigung des Ovars (Skinner et al., 1984, Endocrinology 115, 2418-2432). Der Mechanismus dieses Verlustes der ovariellen Funktion ist bis heute nicht aufgeklärt.

Es wurde nun gefunden, daß durch die Insertion von zur Fertilitätskontrolle geeigneten Genen oder Genfragmenten in einen Sekretionsvektor der

- (a) das vollständige Hämolysin-Operon einschließlich des *hly* spezifischen Promoters und eines Enhancer-ähnlichen Regulators *hlyR* enthält und bei dem
- (b) ein Großteil des *hlyA* Gens deletiert wurde,
- (c) die zur Fertilitätskontrolle geeigneten Proteine oder Proteinfragmente synthetisiert und
- (d) durch die Sekretion dieser Antigene durch attenuierte Salmonellen oder andere Gram-negative attenuierte Impfstämme,
- (e) eine orale Vakzinierung erzeugt wird.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung kodieren die zur Fertilitätskontrolle geeigneten Gene oder Genfragmente für Zona pellucida Proteine.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung kodieren die zur Fertilitätskontrolle geeigneten Gene oder Genfragmente für Zona pellucida Proteine.

In einer weiteren bevorzugten Ausführung ist der Sekretionsvektor pMOhly1.

In einer weiteren bevorzugten Ausführung ist der Salmonella Stamm *Salmonella typhimurium*.

In einer besonders bevorzugten Ausführung kodieren die zur Fertilitätskontrolle geeigneten Gene oder Genfragmente für Zona pellucida Proteine, der Sekretionsvektor ist pMOhly1 und der Salmonella Stamm ist *Salmonella typhimurium*.

Unter zur Fertilitätskontrolle geeignete Gene oder Genfragmente werden alle Gene oder Genfragmente verstanden, die für zur Fertilitätskontrolle geeignete Proteine oder Proteinfragmente kodieren.

Die meisten Proteine, die über die innere Membran Gram-negativer Bakterien in das Periplasma transportiert werden, besitzen ein aminoterminales Signalpeptid, das während dieses *sec*-abhängigen Transportvorgangs abgespalten wird (Pugsley, 1993). Im Gegensatz hierzu wird das Hämolisin (HlyA) von *Escherichia coli* mit Hilfe eines Sekretionssystems über die innere und äußere Membran in das extrazelluläre Medium sezerniert. Im Gegensatz zum klassischen N-terminalen Transportsignal des *sec*-abhängigen Proteintransports trägt HlyA am C-Terminus ein Transportsignal (HlyAS), das von 50-60 Aminosäuren gebildet wird (Hess et al., 1990; Jarchau et al., 1994). Dieses HlyA-Signal wird im Verlauf der Sekretion nicht abgespalten und besitzt selbst kaum ein antigenes Potential.

Das Hämolisin-Sekretionssystem von *E. coli* wird von drei Membranproteinen gebildet. Zwei dieser Proteine, HlyB (Gentschev & Goebel, 1990) und HlyD (Schülein et al., 1992), sitzen in der inneren Membran und werden von Genen codiert, die Teil der Hämolisin-Determinante sind. Diese besteht aus einem Operon einschließlich der vier Gene *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* und *hlyD*.

(Wagner et al., 1983; Hess et al., 1986). Das dritte Protein des Translokationssystems, TolC, ist in der äußeren Membran lokalisiert (Wandersman & Delepelaire, 1990). Die Translokation von HlyA über beide Membranen von Gram-negativen Bakterien erfordert Energie in Form von ATP und eines Membranpotentials der inneren Membran (Koronakis et al., 1995).

In verschiedenen Fällen wurde bereits gezeigt, daß eine Fusion von HlyAS mit anderen Proteinen oder Proteinfragmenten zu einer Sekretion dieser Fusionsproteine mit Hilfe des Hämolysin-Sekretionssystems erfolgt (Blight & Holland 1994; Gentschev et al., 1994). Die Sekretionseffizienz ist hierbei von Faltung und Konformation des Reporterproteins abhängig. Das Hämolysin-Sekretionssystem von *E. coli* ist in attenuierten Salmonellen, die als Impfstämme fungieren, funktionell und kann zum Export von Fusionsproteinen genutzt werden (Gentschev et al., 1992; Su et al., 1992). Die hierzu verwendeten genetischen Systeme basierten bisher auf zwei Komponenten: ein Plasmid, das die für den Transport notwendigen Gene (*hlyB* und *hlyD*) trägt, und ein Plasmid, das die Expression von Fusionsproteinen erlaubt (Gentschev et al., 1992; Hess et al., 1990).

Der Sekretionsvektor pMOhly1 (Gentschev et al., 1995) trägt das vollständige Hämolysin-Operon (Goebel & Hedgpeth, 1982) einschließlich des *hly* spezifischen Promoters und eines "Enhancer"-ähnlichen Regulators *hlyR* (Vogel et al., 1988). Ein Großteil des *hlyA* Gens wurde deletiert, so daß lediglich noch 34 aminotermrale und 61 carboxyterminale Aminosäuren (HlyAS) von HlyA codiert werden. Eine singuläre Nsi I Schnittstelle zwischen aminotermalem und carboxyterminalem Rest von HlyA erlaubt eine Insertion von heterologen Genen oder Genfragmenten im Leseraster zu HlyAS. Die genetische Information für Antigene einer Größe von 10-1000 Aminosäuren kann in diesen Sekretionsvektor pMOhly1 inseriert werden, der die Sekretion dieser Antigene in attenuierten Salmonellen und anderen Gram-negativen attenuierten Impfstämmen (z. B. *E.coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersina enterocolitica*) ermöglicht. Somit wird im Gegensatz zu anderen Sekretionssystemen der Transport von heterologen Fusionsproteinen durch ein einziges Plasmid ermöglicht. Ein weiterer wichtiger Vorteil des Hämolysinsekretionsapparates im Vergleich zu bisher für eine Antigen-Präsentation eingesetzten Transportsystemen, welche nur für den Transport von meist nur relativ kurzen Peptiden auf die Außenseite der Bakterienzelle geeignet sind

(Cardenas & Clements, 1992), ist die bedeutend variablene Größe der transportkompetenten Proteine.

Durch Manipulation des HlyA Sekretionssystems läßt sich dasselbe Antigen in geeigneten attenuierten Gram-negativen Impfstämmen cytoplasmatisch, oberflächengebunden oder in sezernierter Form präsentieren. Durch Einsatz von in Salmonellen sekretionsfähig gemachttem Listeriolysin (aus *Listeria monocytogenes*) kann zusätzlich erreicht werden, daß dasselbe Antigen im Phagosom oder verstärkt im Cytosol der Antigen-präsentierenden Makrophagenzelle nach Infektion mit dem Antigen-produzierenden Salmonella-Impfstamm prozessiert wird (Gentsch et al., 1995). Mit dieser Möglichkeit läßt sich erreichen, daß verstärkte CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten induziert werden (Hess et al., 1996) Da mit diesem Vektorsystem auch Cytokine und lösliche Cytokinrezeptoren getrennt oder in Kombination mit dem zu produzierenden Antigen in attenuierten Salmonellen sezerniert werden könnten (Schülein, 1993; Gentsch, unveröffentlicht), läßt sich die Immunantwort (z. B. in Richtung T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2) zusätzlich variieren.

Die effiziente Sekretion von zur Fertilitätskontrolle geeigneten Proteinen oder Proteinfragmenten/HlyA<sub>S</sub>-Fusionen und die hohe Stabilität des Vektors ermöglichen eine völlig neuartige, hochspezifische kontrazeptive Vakzinierung mit Hilfe attenuierter Salmonellen oder anderer Gram-negativer attenuierter Impfstämme.

Nach oraler Applikation der rekombinanten Salmonellen wird durch Sekretion der zur Fertilitätskontrolle geeigneten Proteine oder Proteinfragment/HlyA<sub>S</sub>-Fusionen das Antigen (zur Fertilitätskontrolle geeignete Proteine oder Proteinfragmente) dem Immunsystem des Wirts zugänglich und führt je nach Protein-Epitop und nach Sekretionsweg zur Aktivierung von B- und/oder T-Zellen. Da HlyA<sub>S</sub> ein schwaches Antigen für B- und T-Zellen darstellt, werden durch HlyA<sub>S</sub>-Fusionen Antikörper und T-Zellen induziert, die hauptsächlich gegen den Teil des Reporter-Antigens gerichtet sind. Attenuierte *Salmonella* und *Yersinia* Stämme, die Antigene sezernieren eignen sich besonders zur Induktion einer humoralen, mucosalen Immunantwort und sind daher bevorzugt. Die Induktion einer mucosalen Immunität resultiert auch in der Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern an entfernt gelegene mucosale

Oberflächen. Daher führt eine B-Zell-Antwort am Infektionsort auch zur Stimulierung einer mucosalen Immunität im Reproduktionstrakt.

Mit der hier offenbarten Erfindung ist es das erste Mal möglich, rekombinante Proteine oder Teile davon ohne aufwendige Herstellungsverfahren für die Erzeugung einer entsprechenden Immunantwort, welche zur Kontrazeption führt, direkt *in situ* zu erzeugen. Mit Hilfe entsprechender Vektoren können diese Proteine oder Proteinabschnitte in Phagosomen, intrazellulär oder extrazellulär zur Expression gebracht werden. Damit können bewußt humorale oder cytotoxische Immunantworten erzeugt werden.

#### Beschreibung der Abbildungen

**Abbildung 1** zeigt eine Vektorkarte des Sekretionsplasmides pMOhly1.

**Abbildung 2** zeigt einen Western-blot, in dem verschiedene pMOhly1/(hu) ZPA/Konstrukte auf die Expression und Sekretion getestet wurden. Nach Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den verschiedenen pMOhly1/(hu) ZPA/Konstrukten wurden 2 ml Überstand von Übernachtkulturen mit 10% (v/v) TCA (Trichloressigsäure) für 4 h auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Überstandsproteine wurden durch SDS-PAGE (Polyacrylamidgelektrophorese) in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit einem polyclonalen Antikörper, der gegen den Hämolisinsinanteil des Fusionsproteins gerichtet ist, auf die Expression und Sekretion getestet. A1 steht für das huZPA-1-Konstrukt (siehe Abbildung 7), A4 steht für das huZPA-4-Konstrukt (siehe Abbildung 7), pMO steht für die Vektorkontrolle und B4 steht für das huZPB-4-Konstrukt (siehe Abbildung 8).

**Abbildung 3** zeigt einen Western-blot, in dem verschiedene pMOhly1/(hu) ZPB/Konstrukte auf die Expression und Sekretion getestet wurden. Nach Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den verschiedenen pMOhly1/(hu) ZPB/Konstrukten wurden 2 ml Überstand von

Übernachtkulturen mit 10% (v/v) TCA (Trichloressigsäure) für 4 h auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Überstandsproteine wurden durch SDS-PAGE (Polyacrylamidgelektrophorese) in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den Hämolsinanteil des Fusionsproteinsgerichtet ist, auf die Expression und Sekretion getestet. B1 steht für das huZPB-1-Konstrukt (siehe Abbildung 8), B2 steht für das huZPB-2-Konstrukt (siehe Abbildung 8), B3 steht für das huZPB-3-Konstrukt (siehe Abbildung 8), B4 steht für das huZPB-4-Konstrukt (siehe Abbildung 8), B5 steht für das huZPB-5-Konstrukt (siehe Abbildung 8) und pMO steht für die Vektorkontrolle.

**Abbildung 4** zeigt einen Western-blot, in dem verschiedene pMOhly1/(hu) ZPC/Konstrukte auf die Expression und Sekretion getestet wurden. Nach Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den verschiedenen pMOhly1/(hu) ZPC/Konstrukten wurden 2 ml Überstand von Übernachtkulturen mit 10% (v/v) TCA (Trichloressigsäure) für 4 h auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Überstandsproteine wurden durch SDS-PAGE (Polyacrylamidgelektrophorese) in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den Hämolsinanteil des Fusionsproteinsgerichtet ist, auf die Expression und Sekretion getestet. C1 steht für das huZPC-1-Konstrukt (siehe Abbildung 9), C2 steht für das huZPC-2-Konstrukt (siehe Abbildung 9), C3 steht für das huZPC-3-Konstrukt (siehe Abbildung 9) und pMO steht für die Vektorkontrolle.

**Abbildung 5** zeigt einen Western-blot, in dem verschiedene pMOhly1/(m) ZPB/Konstrukte auf die Expression und Sekretion getestet wurden. Nach Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den verschiedenen pMOhly1/(m) ZPB/Konstrukten wurden 2 ml Überstand von Übernachtkulturen mit 10% (v/v) TCA (Trichloressigsäure) für 4 h auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Überstandsproteine wurden durch SDS-PAGE (Polyacrylamidgelektrophorese) in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit einem polyklonalen

Antikörper, der gegen den Hämolysinanteil des Fusionsproteinsgerichtet ist, auf die Expression und Sekretion getestet. B1 steht für das mZPB-1-Konstrukt (siehe Abbildung 10), B2 steht für das mZPB-2-Konstrukt (siehe Abbildung 10), B3 steht für das mZPB-3-Konstrukt (siehe Abbildung 10), B4 steht für das mZPB-4-Konstrukt (siehe Abbildung 10) und pMO steht für die Vektorkontrolle.

**Abbildung 6** zeigt einen Western-blot, in dem verschiedene pMO(hu)ZPB/Konstrukte auf Expression und Sekretion getestet wurden. Nach Transformation von *S. typhimurium* SL7207 mit den verschiedenen pMO/(hu)ZPB/Konstrukten wurden 2 ml Überstand von Übernachtkulturen mit 10% (v/v) TCA (Trichloressigsäure) für 4 h auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Überstandsproteine wurden durch SDS-PAGE (Polyacrylamidgelektrophorese) in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den Hämolysinanteil des Fusionsproteinsgerichtet ist, auf die Expression und Sekretion getestet. B1 steht für das huZPB-1-Konstrukt (siehe Abbildung 8), B2 steht für das huZPB-2-Konstrukt (siehe Abbildung 8), B3 steht für das huZPB-3-Konstrukt (siehe Abbildung 8), B4 steht für das huZPB-4-Konstrukt (siehe Abbildung 8), B5 steht für das huZPB-5-Konstrukt (siehe Abbildung 8) und pMO steht für die Vektorkontrolle.

**Abbildung 7** zeigt einen Western-blot, in dem verschiedene pMO(hu)ZPC/Konstrukte auf Expression und Sekretion getestet wurden. Nach Transformation von *Yersinia enterocolitica* WapYv-515 mit den verschiedenen pMO/(hu)ZPC/Konstrukten wurden 2 ml Überstand von Übernachtkulturen mit 10% (v/v) TCA (Trichloressigsäure) für 4 h auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Überstandsproteine wurden durch SDS-PAGE (Polyacrylamidgelektrophorese) in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den Hämolysinanteil des Fusionsproteinsgerichtet ist, auf die Expression und Sekretion getestet. C1 steht für das huZPC-1-Konstrukt (siehe Abbildung 12), C2d steht für das huZPC-2-Konstrukt mit doppeltem Insert (siehe Abbildung 12 ), C3d

steht für das huZPC-3-Konstrukt mit doppeltem Insert (siehe Abbildung 12), C4 steht für das huZPC-4-Konstrukt (siehe Abbildung 12) und pMO steht für die Vektorkontrolle.

**Abbildung 8** zeigt eine Genkarte der cDNA von huZPA. Die Pfeile zeigen die Positionen der für eine PCR-Amplifikation ausgewählten primer (Tabelle 1), wobei die Zahlen den Startpunkt am 5'-Ende des primers bezogen auf das Startcodon der cDNA-Sequenz des Gens angeben. Die gefüllten Rechtecke zeigen das aminotermrale Transportsignal, die putative Fusionsspaltstelle und einen stark hydrophoben Bereich am C-Terminus, der als Membrananker fungieren könnte. Die durch PCR amplifizierten Fragmente sind mit Start und Endpunkt, welche sich durch einen Nsi-I Restriktionsendonukleaseverdau der PCR-Produkte ergeben, im unteren Teil abgebildet und fortlaufend mit huZPA-1, huZPA-2 usw. bezeichnet. Weiterhin ist die Länge der Fragmente sowohl in Basenpaaren (bp) als auch in Aminosäuren (aa) angegeben. Die berechneten Molekulargewichte sind für die Zona-Fragmente und in Klammern für die Zona/HlyA Fusionsproteine in kDa wiedergegeben. Schließlich ist angegeben, ob eine Sekretion der Fusionsproteine mit einem gegen den HlyA-Anteil gerichteten Antikörper nachgewiesen wurde.

**Abbildung 9** zeigt eine Genkarte der CDNA von huZPB. Die Pfeile zeigen die Positionen der für eine PCR-Amplifikation ausgewählten primer (Tabelle 1), wobei die Zahlen den Startpunkt am 5'-Ende des primers bezogen auf das Startcodon der cDNA-Sequenz des Gens angeben. Die gefüllten Rechtecke zeigen das aminotermrale Transportsignal, die putative Fusionsspaltstelle und einen stark hydrophoben Bereich am C-Terminus, der als Membrananker fungieren könnte. Die durch PCR amplifizierten Fragmente sind mit Start und Endpunkt, welche sich durch einen Nsi-I Restriktionsendonukleaseverdau der PCR-Produkte ergeben, im unteren Teil abgebildet und fortlaufend mit huZPB-1, huZPB-2 usw. bezeichnet. Weiterhin ist die Länge der Fragmente sowohl in Basenpaaren (bp) als auch in Aminosäuren (aa) angegeben. Die berechneten Molekulargewichte sind für die Zona-Fragmente und in Klammern für die Zona/HlyA Fusionsproteine in kDa wiedergegeben. Schließlich ist

angegeben, ob eine Sekretion der Fusionsproteine mit einem gegen den HlyA-Anteil gerichteten Antikörper nachgewiesen wurde.

**Abbildung 10** zeigt eine Genkarte der cDNA von huZPC. Die Pfeile zeigen die Positionen der für eine PCR-Amplifikation ausgewählten primer (Tabelle 1), wobei die Zahlen den Startpunkt am 5'-Ende des primers bezogen auf das Startcodon der cDNA-Sequenz des Gens angeben. Die gefüllten Rechtecke zeigen das aminotermrale Transportsignal, die putative Fusionsspaltstelle und einen stark hydrophoben Bereich am C-Terminus, der als Membrananker fungieren könnte. Die durch PCR amplifizierten Fragmente sind mit Start und Endpunkt, welche sich durch einen Nsi-I Restriktionsendonukleaseverdau der PCR-Produkte ergeben, im unteren Teil abgebildet und fortlaufend mit huZPC-1, huZPC-2 usw. bezeichnet. Weiterhin ist die Länge der Fragmente sowohl in Basenpaaren (bp) als auch in Aminosäuren (aa) angegeben. Die berechneten Molekulargewichte sind für die Zona-Fragmente und in Klammern für die Zona/HlyA Fusionsproteine in kDa wiedergegeben. Schließlich ist angegeben, ob eine Sekretion der Fusionsproteine mit einem gegen den HlyA-Anteil gerichteten Antikörper nachgewiesen wurde.

**Abbildung 11** zeigt eine Genkarte der cDNA von mZPB. Die Pfeile zeigen die Positionen der für eine PCR-Amplifikation ausgewählten primer (Tabelle 1), wobei die Zahlen den Startpunkt am 5'-Ende des primers bezogen auf das Startcodon der cDNA-Sequenz des Gens angeben. Die gefüllten Rechtecke zeigen das aminotermrale Transportsignal, die putative Fusionsspaltstelle und einen stark hydrophoben Bereich am C-Terminus, der als Membrananker fungieren könnte. Die durch PCR amplifizierten Fragmente sind mit Start und Endpunkt, welche sich durch einen Nsi-I Restriktionsendonukleaseverdau der PCR-Produkte ergeben, im unteren Teil abgebildet und fortlaufend mit mZPB-1, huZPB-2 usw. bezeichnet. Weiterhin ist die Länge der Fragmente sowohl in Basepaaren (bp) als auch in Aminosäuren (aa) angegeben. Die berechneten Molekulargewichte sind für die Zona-Fragmente und in Klammern für die Zona/Hly A Fusionsproteine in kDa wiedergegeben. Schließlich ist

**Abbildung 12** zeigt eine Genkarte der cDNA von huZPC. Die Pfeile zeigen die Positionen der für eine PCR-Amplifikation ausgewählten primer (Tabelle 1), wobei die Zahlen den Startpunkt am 5'-Ende des primers bezogen auf das Startcodon der cDNA-Sequenz des Gens angeben. Die durch PCR amplifizierten Fragmente sind mit Start und Endpunkt, welche sich durch einen Nsi-I Restriktionsendonukleaseverdau der PCR-Produkte ergeben, im unteren Teil abgebildet und fortlaufend mit huZPC-1, huZPC-2 usw. bezeichnet. Weiterhin ist die Länge der Fragmente sowohl in Basenpaaren (bp) als auch in Aminosäuren (aa) angegeben. Die berechneten Molekulargewichte sind für die Zona-Fragmente und in Klammern für die Zona/HlyA Fusionsproteine in kDa wiedergegeben. Schließlich ist angegeben, ob eine Sekretion der Fusionsproteine mit einem gegen den HlyA-Anteil gerichteten Antikörper nachgewiesen wurde.

Es wird davon ausgegangen, daß der Fachmann die vorliegende Erfindung aufgrund der Beschreibung in ihrem ganzen Umfang ausführen kann. Viele bekannte Techniken und Protokolle zur Manipulation von Nucleinsäuren, wie beispielsweise Mutagenese, Sequenzierung, das Einführen von Nucleinsäure in Zellen oder die Analyse von Proteinen ist im Detail in Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausribel et al. Eds., John Wiley & Sons, 1992; Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2<sup>nd</sup> edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Der Inhalt von Sambrook et al. und Ausribel et al. ist hiermit als Referenz inkooperiert.

Die vorliegende Erfindung beinhaltet für alle Verwendungen und Methoden, welche beschrieben sind pharmazeutische Präparate. So beinhaltet die Erfindung beispielsweise pharmazeutische Präparate, die die attenuierten Bakterien mit dem Sekretionsvektor gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten. Die orale Administration erfolgt bevorzugt in Form von verkapselt biodegradierbaren Polymeren, beispielsweise PLPG.

Die nachfolgenden Beispiele dienen nur der näheren Beschreibung und zeigen, daß die Erfindung ausführbar ist und sollen in keiner Weise einschränkend wirken.

Beispiel 1**Klonierung und Expression von huZPA, huZPB, huZPC und mZPB Fragmenten in *E. coli* und *S. typhimurium***

Ausgangspunkt der Klonierungsstrategie sind die Plasmide pGEX-KG-huZPA, pGEX-KG-huZPB und pGEX-KG-huZPC (Peter Bringmann, Schering AG), welche die cDNA des humanen ZPA, ZPB- und ZPC-Gens tragen sowie ovarielle mRNA der Maus, welche die cDNA-Synthese des Maus ZPB-Gens ermöglichte. Ausgehend von mRNA isoliert aus Ovarien superovulierender Mäuse (Uwe Eberspächer, Schering AG) wurde die entsprechende cDNA wie folgt synthetisiert: ca 5 µg RNA wurden in 32 µl DEPC-H<sub>2</sub>O mit 3 µl Oligo-dT-Primer vermischt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Den Ansatz lässt man 10 min bei Raumtemperatur abkühlen und fügt folgende Reagenzien zu: 5 µl Synthese-Puffer, 5 µl 0.1 M DTT, 1 µl RNase Inhibitor, 3 µl 25 mM dNTPs und 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) (1st Strand Synthesis Kit, Stratagene). Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden (Tabelle I) wurden durch PCR von der entsprechenden cDNA überlappende Genfragmente amplifiziert, die 5' und 3' Nsi I-Restriktionsschnittstellen aufweisen (Abbildungen 8 bis 12: Karten der ZP-Gene mit Angabe der Primerpositionen und den daraus resultierenden Genfragmenten). Die PCR-Amplifikation (Saiki et al., 1988) wurde in einem Thermocycler 60/2 (bio-med, Theres, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde cDNA mit den entsprechenden 5'- und 3'-Primern (je 1 µM Endkonzentration), dNTPs (je 200 µM) und 2.5 U Taq DNA-Polymerase (Promega) und dem Puffer des Herstellers in einem Volumen von 100 µl amplifiziert. Vor dem ersten Zyklus erfolgte eine Denaturierung für 3 min bei 91°C. Darauf folgten 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen: 1 min Denaturierung bei 91 °C, 1 min Annealing bei 55 °C und 1 min Extension bei 72 °C. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Diese PCR-Produkte wurden zunächst "blunt" in die Sma I-Schnittstelle des Vektors pUC18

inseriert. Anschließend wurde das ZP-Fragment durch einen Nsi I-Verdau herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pMOhly1 (Abbildung 1) inseriert. Nach Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den verschiedenen pMOhly1/ZP-Konstrukten wurden 2 ml Überstand von Übernachtkulturen mit 10% (v/v) TCA für 4 h auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Überstandsproteine wurden durch SDS-PAGE in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose auf die Sekretion von Zona/Hämolsin-Fusionsproteinen getestet. Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers, der gegen den Hämolsinanteil des Fusionsproteins gerichtet ist, konnte die Expression und Sekretion von zwei huZPA-Fragmenten (A1 und A4, Abbildung 2) und vier huZPB-Fragmenten (B1 - B4, Abbildung 3) nachgewiesen werden. Für huZPC wurde eine transportkompetente Domäne identifiziert (C1, Abbildung 4). Analog zu huZPB konnte auch die Sekretion von drei Proteinfragmenten von mZPB durch das Transportsystem gezeigt werden (B1 - B3, Abbildung 5).

Anschließend erfolgte die Transformation der beschriebenen pMOhly1-Derivate in den Stamm *S. typhimurium* LB5000, dem das Restriktionssystem fehlt, so daß effizient *E. coli*-DNA in diesen Stamm eingebracht werden kann. Nach Isolierung der rekombinanten Expressionsvektoren aus *S. typhimurium* LB5000 konnte der Stamm *S. typhimurium* SL7207 erfolgreich transformiert werden. Dieser Stamm eignet sich wie schon mehrfach beschrieben als Impfstamm. Auch in diesem Stamm erfolgt die Sekretion der ZP/Hly-Fusionsproteinen. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Expression und Sekretion der huZPB-Fragmente in *Salmonella*. Diese ZP/Hly exprimierenden Salmonellen sollten in Mäusen nach oraler Applikation eine mucosale Immunität induzieren, die auch spezifisch gegen den ZP-Anteil des Fusionsproteins gerichtet ist.

Beispiel 2**Klonierung und Expression von huZPC, huZPB, huZPC und mZPB Fragmenten in *Y. enterocolitica***

Ausgangspunkt der Klonierungsstrategie sind die Plasmide pGEX-KG-huZPA, pGEX-KG-huZPB und pGEX-KG-huZPC (Peter Bringmann, Schering AG), welche die cDNA des humanen ZPA, ZPB- und ZPC-Gens tragen sowie ovarielle mRNA der Maus, welche die cDNA-Synthese des Maus ZPB-Gens ermöglichte. Ausgehend von mRNA isoliert aus Ovarien superovulierender Mäuse (Uwe Eberspächer, Schering AG) wurde die entsprechende cDNA wie folgt synthetisiert: ca 5 µg RNA wurden in 32 µl DEPC-H<sub>2</sub>O mit 3 µl Oligo-dT-Primer vermischt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Den Ansatz lässt man 10 min bei Raumtemperatur abkühlen und fügt folgende Reagenzien zu: 5 µl Synthese-Puffer, 5 µl 0.1 M DTT, 1 µl RNase Inhibitor, 3 µl 25 mM dNTPs und 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) (1st Strand Synthesis Kit, Stratagene). Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden (Tabelle I) wurden durch PCR von der entsprechenden cDNA überlappende Genfragmente amplifiziert, die 5' und 3' Nsi I-Restriktionsschnittstellen aufweisen (Abbildungen 8 bis 12: Karten der ZP-Gene mit Angabe der Primerpositionen und den daraus resultierenden Genfragmenten). Die PCR-Amplifikation (Saiki et al., 1988) wurde in einem Thermocycler 60/2 (bio-med, Theres, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde cDNA mit den entsprechenden 5'- und 3'-Primern (je 1 µM Endkonzentration), dNTPs (je 200 µM) und 2.5 U Taq DNA-Polymerase (Promega) und dem Puffer des Herstellers in einem Volumen von 100 µl amplifiziert. Vor dem ersten Zyklus erfolgte eine Denaturierung für 3 min bei 91°C. Darauf folgten 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen: 1 min Denaturierung bei 91 °C, 1 min Annealing bei 55 °C und 1 min Extension bei 72 °C. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Diese PCR-Produkte wurden zunächst "blunt" in die Sma I-Schnittstelle des Vektors pUC18 inseriert. Anschließend wurde das ZP-Fragment durch einen Nsi I-Verdau herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pMOhly1 (Abbildung 1) inseriert. Nach Transformation von *E. coli* DH5α mit den verschiedenen pMOhly1/ZP-Konstrukten wurden 2 ml Überstand von

Übernachtkulturen mit 10% (v/v) TCA für 4 h auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Überstandsproteine wurden durch SDS-PAGE in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose auf die Sekretion von Zona/Hämolsin-Fusionsproteinen getestet. Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers, der gegen den Hämolsinanteil des Fusionsproteins gerichtet ist, konnte die Expression und Sekretion von huZPA-Fragmenten, huZPB-Fragmenten und huZPC nachgewiesen werden (siehe oben). Anschließend erfolgte die Transformation der beschriebenen pMOhly1-Derivate in den Stamm *Y. enterocolitica* LB5000, dem das Restriktionssystem fehlt, so daß effizient *E. coli*-DNA in diesen Stamm eingebracht werden kann. Nach Isolierung der rekombinanten Expressionsvektoren aus *Y. enterocolitica* LB5000 konnte der Stamm *Y. enterocolitica* WapYv-515 erfolgreich transformiert werden. Dieser Stamm eignet sich wie schon mehrfach beschrieben als Impfstamm. Auch in diesem Stamm erfolgt die Sekretion der ZP/Hly-Fusionsproteine. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Expression und Sekretion der huZPC-Fragmente in *Y. enterocolitica*. Diese ZP/Hly exprimierenden Yersinien sollten in Mäusen nach oraler Applikation eine mucosale Immunität induzieren, die auch spezifisch gegen den ZP-Anteil des Fusionsproteins gerichtet ist.

-16-

Tabelle I: Primersequenzen für die Amplifikation von ZP-Genfragmenten durch PCR und erwartete PCR-Produktgrößen

ZP-Fragment		PCR-Produkt (bp)
<b>huZPA</b>		
huZPA1	5'-GAAATGGCATGCATGCATCTGTG-3' 5'-GCTGAAG <u>CATGCAT</u> TCATGGCCTC-3'	390
huZPA2	5'-CTGCCAG <u>ATGCAT</u> TAAGGAAGGC-3' 5'-GTCAGCTTGAAT <u>GCAT</u> CTAAGTAGAAC-3'	408
huZPA3	5'-CGAAATT <u>ATGCAT</u> ATGCCTAC-3' 5'-GAGTAAGG <u>CATGCAT</u> CGTTGATG-3'	456
huZPA4	5'-GTGAAGT <u>ATGCAT</u> ATAGCAGG-3' 5'-CATATGCAC <u>ATGCAT</u> CCACGACAAC-3'	318
huZPA5	5'-CACCATGG <u>ATGCAT</u> ACTCTTCC-3' 5'-GCCTAGAGG <u>ATGCAT</u> GGCAGGTCAC-3'	249
<b>huZPB</b>		
huZPB1	5'-GCTTCCAGT <u>ATGCAT</u> AAACCTC-3' 5'-CGCGCCT <u>GATGCAT</u> CAACTCCAAC-3'	207
huZPB2	5'-GTGGTGT <u>GGATGCAT</u> CCTATAGC-3' 5'-CAGGGTTAC <u>ATGCAT</u> GTCAATTCC-3'	399
huZPB3	5'-CTCTTGG <u>ATGCAT</u> CGCTTGGCC-3' 5'-CTTCACCA <u>ATGCAT</u> AGTCACCAAC-3'	375
huZPB4	5'-GAGACCCAG <u>GCATCCCTCACTC</u> -3' 5'-GCCTT <u>GCTAGATGCAT</u> AGCAGTAG-3'	498
huZPB5	5'-GCCAGCCTG <u>CTGATGCAT</u> CATCCTG-3' 5'-CAGCCAAGT <u>AGGATGCAT</u> ACAAGGC-3'	213

ZP-Fragment		PCR-Produkt (bp)
<b>huZPC</b>		
huZPC1	5'-GCCAGCCAT <u>GCAT</u> AGACGTCCGTAC-3'	495
	5'-CAGTGTGGATT <u>ATGCAT</u> GGAGGTG-3'	
huZPC2	5'-GAGAACTGGAAT <u>GCAT</u> AGAAGAGG-3'	366
	5'-CCAGCTGTTGGAT <u>GCATT</u> GCTGAAG-3'	
huZPC2'	5'-CAATGTGAGCAGCCAT <u>GCAT</u> TCCTGC-3'	285
	5'-GAATGCAGAAGAT <u>GCAT</u> CAGTGAG-3'	
huZPC3	5'-CAGGACCCAGAT <u>GCAT</u> CAACAAG-3'	363
	5'-CACAGGGTGGGAT <u>GCAT</u> TGCGACAC-3'	
huZPC3'	5'-GACCAGAAT <u>GCAT</u> CCCTTATCAC-3'	360
	5'-GGTTACGGGAT <u>GCAT</u> ACCTGGAC-3'	
huZPC4	5'-GCCAGCCAT <u>GCAT</u> ATAACGTCCGTAC-3'	936
	5'-GGTTACGGGAT <u>GCAT</u> ACCTGGAC-3'	
<b>mZPB</b>		
mZPB1	5'-GAATACAGCTAT <u>GCAT</u> GTGGGGTAC-3'	450
	5'-GCAGGAGAT <u>GCAT</u> GGATGAAGCTC-3'	
mZPB2	5'-CACACCTTGGAT <u>GCAT</u> CTGGCCAC-3'	408
	5'-CATCCGTTGGAT <u>GCAT</u> AGGCCAG-3'	
mZPB3	5'-GCCTTGACACAT <u>GCAT</u> CCCTGCTAG-3'	339
	5'-CTTATCCGAT <u>GCAT</u> CCCTCAGCTC-3'	
mZPB4	5'-GTGACTCAAT <u>ATGCAT</u> CCCTGAGGC-3'	393
	5'-CAGAGGGTGGCAT <u>GCAT</u> AGGCACACTAC-3'	

Unterstrichene Basen zeigen eine Abweichung von der jeweiligen ZP-Sequenz an, um die für eine Klonierung notwendige Nsi I Schnittstelle einzuführen.

**Ansprüche**

1. Verwendung eines Sekretionsvektors in dem
  - (a) zur Fertilitätskontrolle geeignete Gene oder Genfragmente insertiert sind, der
  - (b) das vollständige Hämolysin-Operon einschließlich des *hly* spezifischen Promotors und eines Enhancer-ähnlichen Regulators *hlyR* enthält und bei dem
  - (c) ein Großteil des *hlyA* Gens deletiert wurde, wobei
  - (d) die zur Fertilitätskontrolle geeigneten Proteine oder Proteinfragmente synthetisiert werden und
  - (e) durch die Sekretion dieser Antigene durch attenuierte Salmonellen oder andere Gram-negative attenuierte Impfstämme,
  - (f) eine orale Vakzinierung erzeugt wird.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die zur Fertilitätskontrolle geeigneten Gene oder Genfragmente für Zona pellucida Proteine kodieren.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Sekretionsvektor pMOhly1 ist.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Salmonella Stamm *Salmonella typhimurium* ist.
5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Stamm *Yersinia enterocolitica* ist.
6. Verfahren zur Fertilitätskontrolle durch Verwendung eines Sekretionsvektors in dem
  - (a) zur Fertilitätskontrolle geeignete Gene oder Genfragmente insertiert sind, der
  - (b) das vollständige Hämolysin-Operon einschließlich des *hly* spezifischen Promotors und eines Enhancer-ähnlichen Regulators *hlyR* enthält

und bei dem

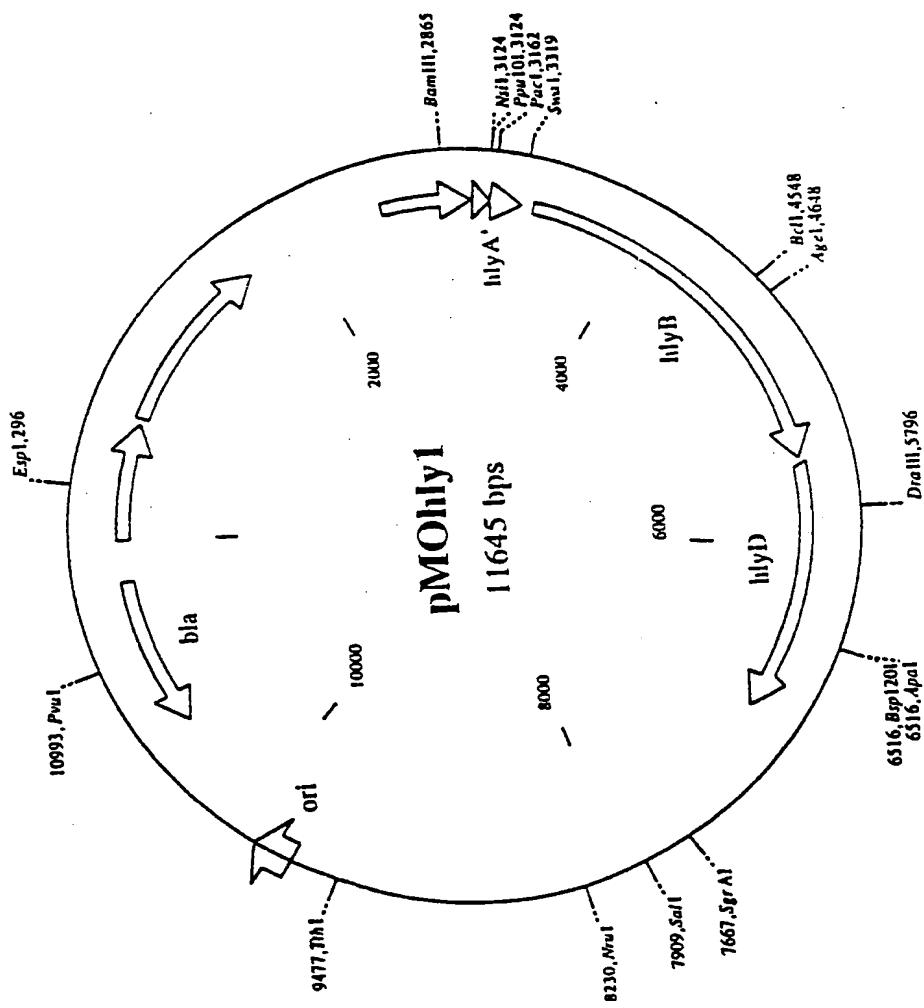
(c) ein Großteil des hlyA Gens deletiert wurde,

wobei

(d) die zur Fertilitätskontrolle geeigneten Proteine oder Proteinfragmente synthetisiert werden und

(e) durch die Sekretion dieser Antigene durch attenuierte Salmonellen oder andere Gram-negative attenuierte Impfstämme,

(f) eine orale Vakzinierung erzeugt wird.



## Expression und Sekretion von huZPA-Fragmenten in *E. coli* DH5 $\alpha$

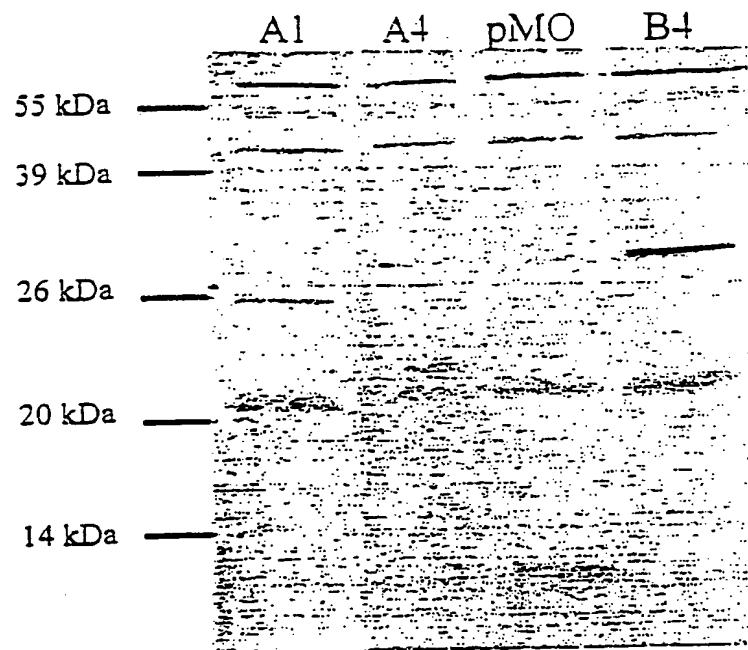


Abbildung 2

## Expression und Sekretion von huZPB-Fragmenten in *E. coli* DH5 $\alpha$

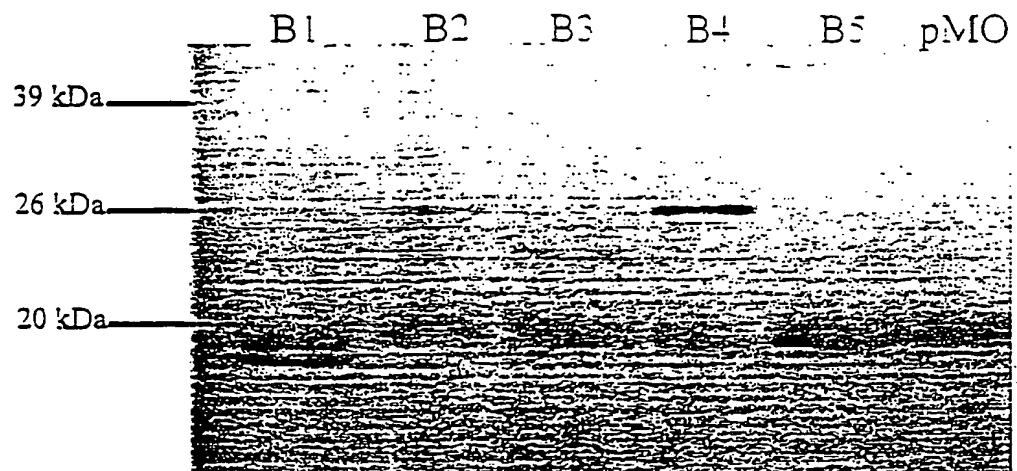


Abbildung 3

## Expression und Sekretion von huZPC-Fragmenten in *E. coli* DH5 $\alpha$

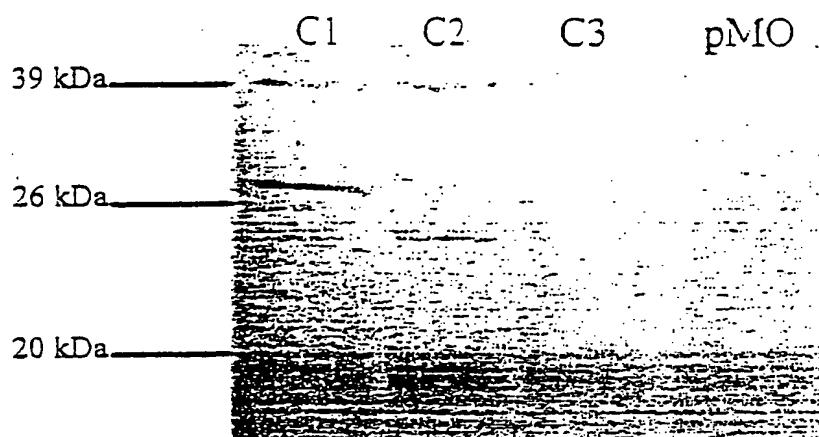


Abbildung 4

## Expression und Sekretion von mZPB-Fragmenten in *E. coli* DH5 $\alpha$

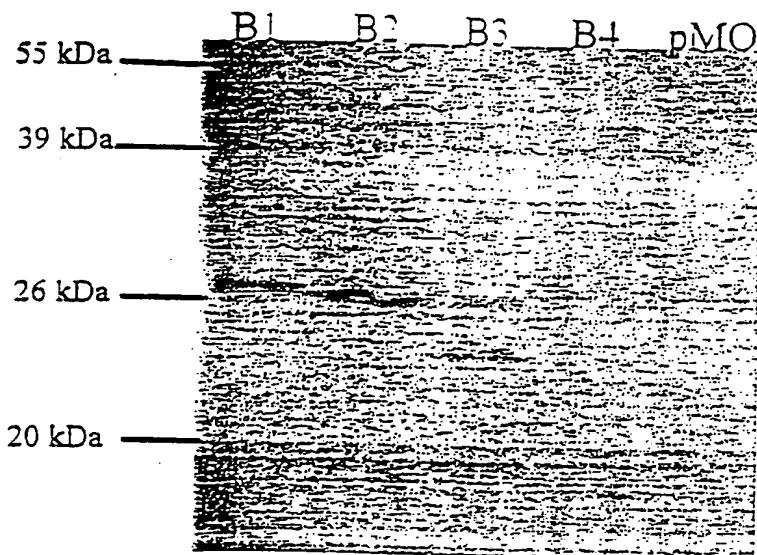


Abbildung 5

## Expression und Sekretion von huZPB-Fragmenten in *S. typhimurium* SL7207

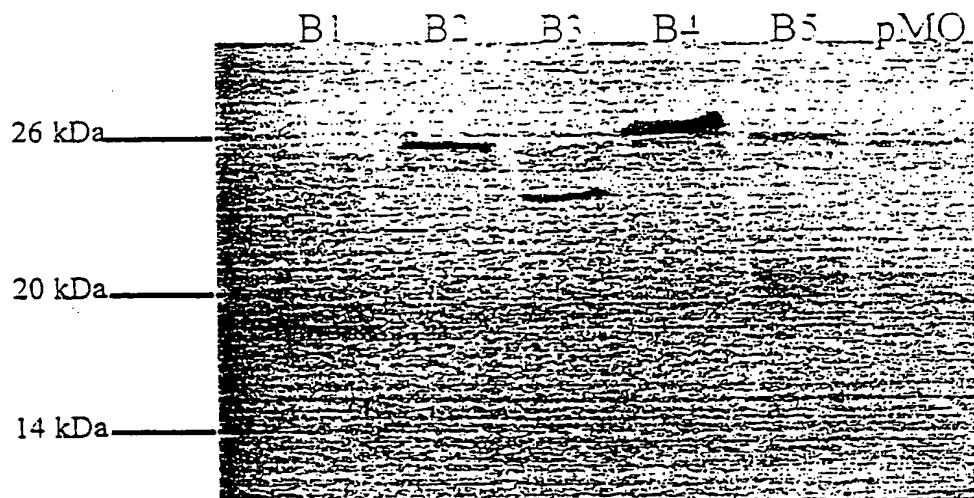


Abbildung 5

Expression und Sekretion von huZPC-Fragmenten in  
*Y. enterocolitica* WApYv-515

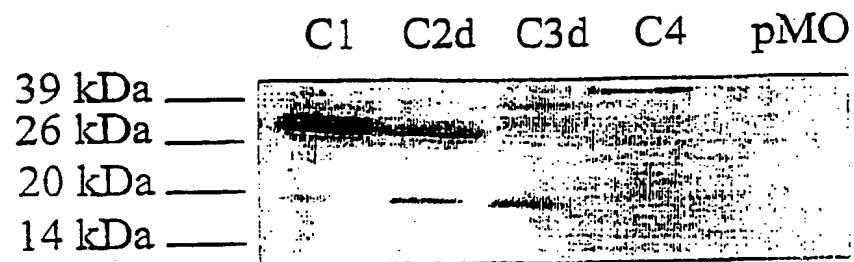


Abbildung 7

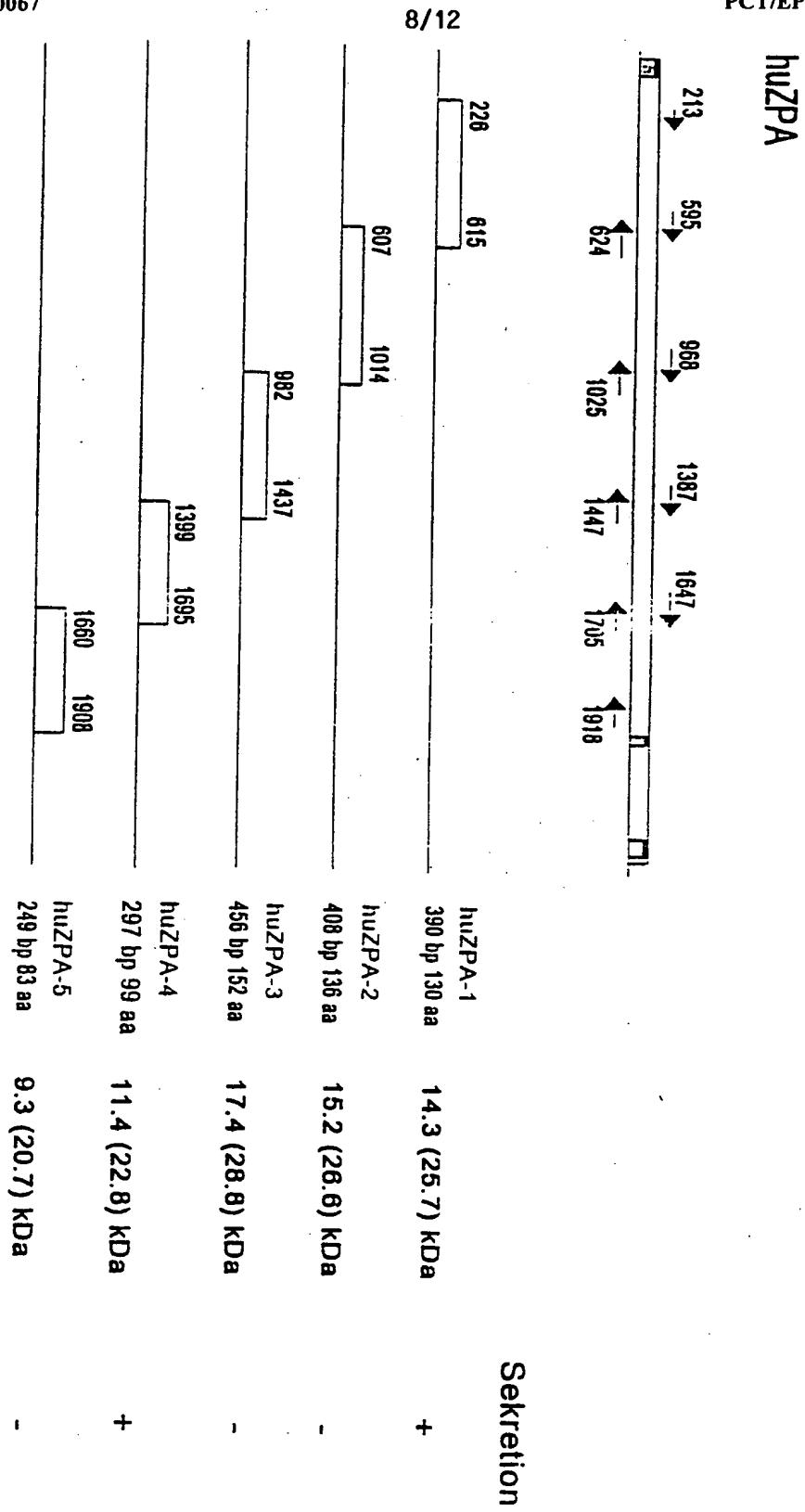


Abbildung 8

9/12

## huZPB

Sekretion

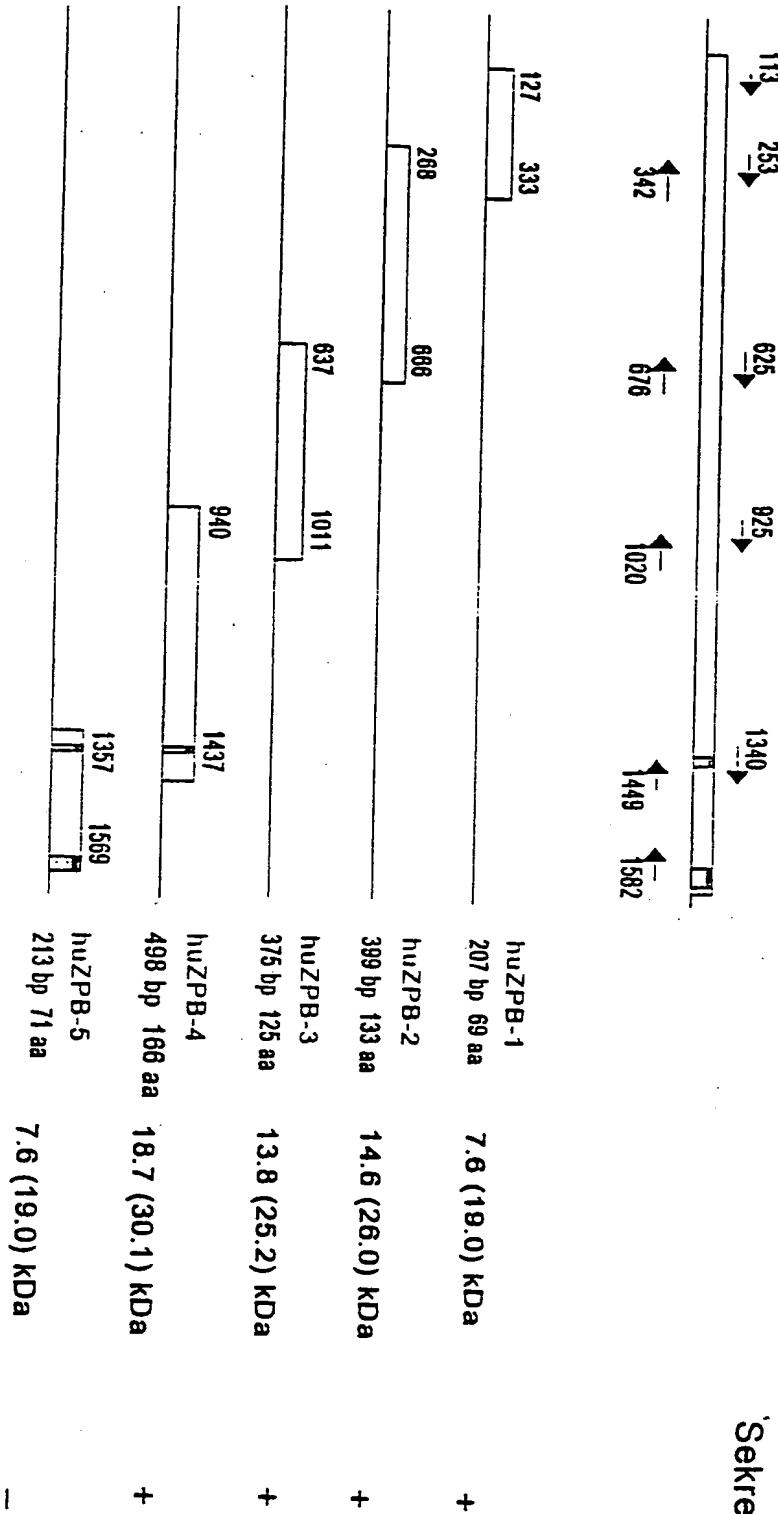
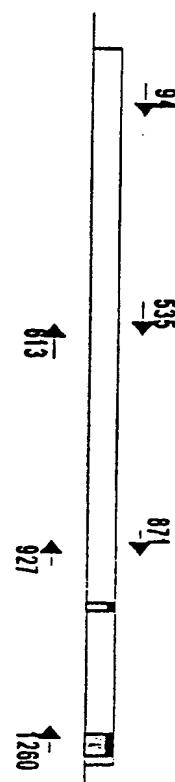


Abbildung 9

10/12

## huZPC



Sekretion

## huZPC-1

495 bp 165 aa 18.4 (29.8) kDa

+

## huZPC-2

366 bp 122 aa 13.5 (24.9) kDa

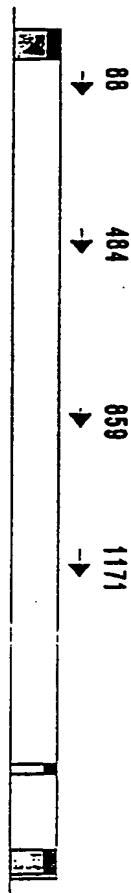
-

## huZPC-3

363 bp 121 aa 16.4 (27.8) kDa

-

## mZPB



11/12

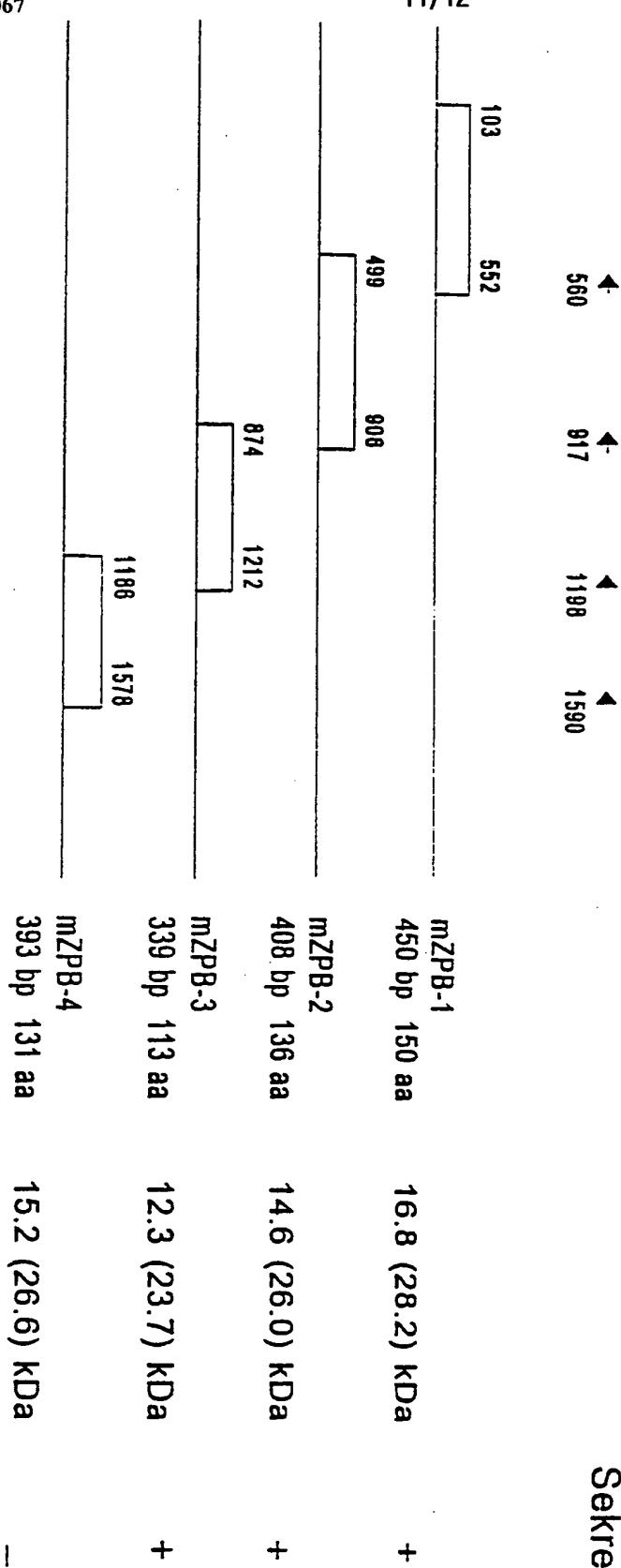
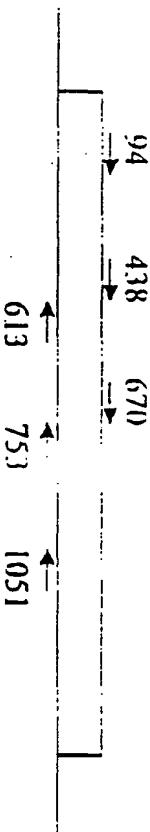


Abbildung 11

## huZPC

## Sekretion



106  
[36      200]

600

457  
[153      247]

741

huZPC-1

495 bp, 165 aa, 18.4 kDa

+

29.8 kDa

huZPC-2

285 bp, 95 aa, 10.7 kDa

22.1 kDa

huZPC-2d: 32.8 kDa

+

huZPC-3

360 bp, 120 aa, 13.3 kDa

24.7 kDa

huZPC-3d: 38.0 kDa

+

+

huZPC-4

936 bp, 312 aa, 34.7 kDa

46.1 kDa

+

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**